

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 8月19日

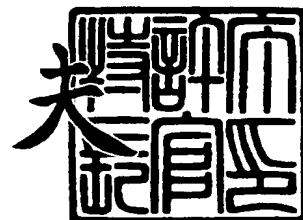
出願番号
Application Number: 特願2003-295523
[ST. 10/C]: [JP 2003-295523]

出願人
Applicant(s): 株式会社 エフェクター細胞研究所
落谷 孝広

2004年 3月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



出証番号 出証特2004-3015450

【書類名】 特許願
【整理番号】 KAN-X0301
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成15年 8月19日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区築地 5 - 1 - 1 国立がんセンター築地宿舎 2 1 8 号
 【氏名】 落谷 孝広
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県松戸市三矢小台 3 - 1 8 - 2 2 ソレアード 2 2 0 1 号 室
 【氏名】 寺谷 工
【特許出願人】
 【識別番号】 500201406
 【氏名又は名称】 株式会社 エフェクター細胞研究所
【特許出願人】
 【住所又は居所】 東京都中央区築地 5 - 1 - 1 国立がんセンター築地宿舎 2 1 8 号
 【氏名又は名称】 落谷 孝広
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) および (b) の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

(a) 多分化能を有する細胞を以下の (i) ~ (i i i) のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

(i) 酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

(i i) アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

(i i i) アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

(b) 工程 (a) で培養された細胞をオンコスタチンMを含む培地で培養する工程

【請求項 2】

工程 (a) でゼラチンコーティング培養皿を用い、工程 (b) でI型コラーゲンコーティング培養皿またはラミニンコーティング培養皿を用いる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下の (a) および (b) の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

(a) 多分化能を有する細胞をレチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む培地で培養する工程

(b) 工程 (a) で培養された細胞を以下の (i) ~ (i i i) のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

(i) 酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

(i i) アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

(i i i) アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

【請求項 4】

工程 (a) および (b) でゼラチンコーティング培養皿を用いる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

(a) 多分化能を有する細胞をレチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む培地で培養する工程

(b) 工程 (a) で培養された細胞を以下の (i) ~ (i i i) のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

(i) 酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

(i i) アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

(i i i) アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

(c) 工程 (b) で培養された細胞をオンコスタチンMを含む培地で培養する工程

【請求項 6】

工程 (a) および (b) でゼラチンコーティング培養皿を用い、工程 (c) でI型コラーゲンコーティング培養皿またはラミニンコーティング培養皿を用いる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

多分化能を有する細胞が哺乳動物由来である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

哺乳動物が、ヒト、サル、マウス、ラット、またはブタである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

多分化能を有する細胞が、胚性幹細胞、成人幹細胞、間葉系幹細胞、または臍帯血細胞である、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1～4 のいずれかに記載の (a) および (b) の工程、または請求項 5 もしくは 6 に記載の (a)～(c) の工程を含む、肝細胞の製造方法。

【請求項 11】

肝細胞が成熟肝細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

多分化能を有する細胞が哺乳動物由来である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物が、ヒト、サル、マウス、ラット、またはブタである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

多分化能を有する細胞が、胚性幹細胞である、請求項 10～13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

請求項 10～14 のいずれかに記載の方法により製造された肝細胞。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の肝細胞を含む、肝疾患の治療剤。

【請求項 17】

肝疾患が、肝硬変、劇症肝炎、胆道閉鎖症、肝癌、または肝炎である、請求項 16 に記載の治療剤。

【請求項 18】

以下の (a)～(c) のいずれかを含むキット。

(a) 酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

(b) アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

(c) アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

【請求項 19】

さらに、オンコスタチンMを含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

さらに、レチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む、請求項 19 に記載のキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】多分化能を有する細胞の分化誘導方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、多分化能を有する細胞の分化誘導方法に関する。

【背景技術】

【0002】

再生治療に対する関心は増大しつつあり、過去数年のあいだに、骨髄および肝幹様細胞に生体材料を用いることによる肝細胞の形成に関していくつかの研究が行われている（非特許文献1および2参照）。当時本発明者らは、胚性幹（ES）細胞が分化能を有していることを認めていた。クローン化細胞株が、ミソジニック（misogynic）C不活化ST0線維芽細胞を含むゼラチン前処置培養皿においてマウス胚の内細胞塊によるいくつかの分化活性を有していたことで（非特許文献3、4および5参照）、ES細胞が初めて確立された。ES細胞は、フィーダー細胞層または白血病阻害因子（LIF）の存在下で、その未分化状態を維持する条件では半永久的に増殖する（非特許文献6参照）。ES細胞を浮遊培養において分化させると、胚様体（EBs）と呼ばれる球状の多細胞集合体を形成し、このEBsは多様な細胞集団を含むことが示されている。実際に、ES細胞インビトロ分化系を利用して、ニューロン、心筋および造血細胞の分化プロセスが研究されている（非特許文献7～10参照）。このように、ES細胞の分化は、臓器内胚葉形成を研究するための有用なモデルとなり、移植医学の新たな可能性を提供する。

【0003】

最近、この生体材料は、数人のデイジー（daisies）患者の細胞療法における治療で用いられることが示された。例えば、肝細胞転写因子（HNF）-3 β をトランスフェクトしたES細胞は、培地中にさらに線維芽細胞増殖因子（FGF-2）を4ヶ月間加えることによって培養したアルブミン誘導細胞と区別された（非特許文献11参照）。さらに、18日間培養してEBsを肝細胞へ分化させ、これをゼラチンコーティング培養皿に播種して、LIFおよび増殖因子を加えずに21～30日間インキュベートして（非特許文献12および13参照）、EBsからの肝細胞の形成物をI型コラーゲンコーティング培養皿に播種して、増殖因子（酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、およびオンコスタチンM（OsM））、デキサメタゾン、およびIST（インスリンとトランスフェリンの混合物）と共に18日間培養した。しかし、ES細胞から肝細胞を形成した全ての例がインビトロでのEBs形成を必要とした。EBsから形成された機能細胞は、奇形腫の形成等のいくつかの問題を有する。また、ES細胞からEBsを形成するには手間がかかる他、一般に分化の割合は低く、それ以外の多くの細胞の分化を起こさせてしまい、肝細胞の純化のステップが必要となる。EBsを介さずにES細胞から細胞分化を試みた研究は少なく、Aubertらの神経細胞分化の誘導が唯一の例である（非特許文献14参照）。

【0004】

尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】Schwartz RE, Reyer M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest. 109 : 1291-1302, 2002

【非特許文献2】Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H : Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. J Cell Biol. 156 : 173-184. 2002

【非特許文献3】Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 292:154-156, 1981

【非特許文献4】Martin GR : Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

Proc Natl Acad Sci USA. 78 : 7634-7638. 1981

【非特許文献 5】Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E : Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature. 309 : 255-256. 1984

【非特許文献 6】Williams RL, Hilton DJ, Pease S et al : Myeloid leukaemia in inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336: 684-687, 1988

【非特許文献 7】Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR : Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. Genes Dev. 5: 728-740. 1991

【非特許文献 8】Keller GM : In vitro differentiation of embryonic stem cells. Cur Opin Cell Biol. 7 : 862-869. 1995

【非特許文献 9】Sanchez-Carpintero R, Narbona J : Executive system: a conceptual review and its study in children with attention deficit hyperactivity disorder. Rev Neurol. 33 : 47-53, 2001

【非特許文献 10】Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI : Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol. 196 : 342-357 : 1995

【非特許文献 11】Ishizaka, S., Shiroy, A., et al. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3 β gene. FEBS J. 16: 1444-1446, 2002.

【非特許文献 12】Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abe S, Abe K : Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. Exp. Cell Res. 229 : 27-34. 1996

【非特許文献 13】Miyashita H, Suzuki A, Fukao K, Nakauchi H Taniguchi : Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro. Cell Transplantation. 11 : 429-434. 2002

【非特許文献 14】Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A : Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. 20 : 1240-1245. 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、多分化能を有する細胞の分化誘導に関与する因子を同定し、該因子を利用した効率のよい細胞の分化誘導法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

ES細胞は、成体動物の如何なる細胞タイプにも分化することができる。最近、ES細胞が肝細胞に分化することが判明した。しかし、その基礎となるメカニズムはよくわかっていない。本発明者らは、既に、ES細胞およびCCl₄処置マウス系を用いて成熟肝細胞が形成されることを見出している (Yamamoto H, et al., Hepatology. 37 : 983-993. 2003)。本発明において、cDNAマイクロアレイ技術によって偽処置およびCCl₄処置マウス肝臓の間で24時間後に発現が変化する遺伝子を分析し、いくつかの増殖因子を選択した。次に、ES細胞の肝細胞分化率に及ぼすマトリクスおよび増殖因子の影響を調べた。その結果、異なる2つのマトリクス培養皿において、いくつかの増殖因子含有培地での単純な接着単培養 (adherent monoculture) によって、EBsを介さずに、マウスES細胞から肝細胞の分化に成功した。マウスES細胞由来分化細胞における肝臓の主要遺伝子の発現、ならびに肝特異的代謝活性を調べた結果、ES細胞由来分化細胞は肝細胞特有の特徴を有することが判明した。さらに、カニクイザルES細胞から肝細胞の分化に成功した。これらの結果は、ES細胞が機

能的肝細胞に分化する際に、EBsの介在も同時培養系も必要ではないことを示唆している。さらに、本発明者らはES由来肝細胞の移植は肝硬変に対して治療的効果を示すことを見出した。

【0007】

このように本発明は、細胞の移植および組織の操作のような新しい治療戦略にとって新しい肝細胞源となる証拠を提供する。

【0008】

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔20〕を提供するものである。

〔1〕 以下の（a）および（b）の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

（a）多分化能を有する細胞を以下の（i）～（iii）のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

（i）酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

（ii）アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

（iii）アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

（b）工程（a）で培養された細胞をオンコスタチンMを含む培地で培養する工程

〔2〕 工程（a）でゼラチンコーティング培養皿を用い、工程（b）でI型コラーゲンコーティング培養皿またはラミニンコーティング培養皿を用いる、〔1〕に記載の方法。

〔3〕 以下の（a）および（b）の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

（a）多分化能を有する細胞をレチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む培地で培養する工程

（b）工程（a）で培養された細胞を以下の（i）～（iii）のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

（i）酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

（ii）アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

（iii）アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

〔4〕 工程（a）および（b）でゼラチンコーティング培養皿を用いる、〔3〕に記載の方法。

〔5〕 以下の（a）～（c）の工程を含む、多分化能を有する細胞の分化誘導方法。

（a）多分化能を有する細胞をレチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む培地で培養する工程

（b）工程（a）で培養された細胞を以下の（i）～（iii）のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する工程

（i）酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

（ii）アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

（iii）アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

（c）工程（b）で培養された細胞をオンコスタチンMを含む培地で培養する工程

〔6〕 工程（a）および（b）でゼラチンコーティング培養皿を用い、工程（c）でI型コラーゲンコーティング培養皿またはラミニンコーティング培養皿を用いる、〔5〕に記載の方法。

〔7〕 多分化能を有する細胞が哺乳動物由来である、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕 哺乳動物が、ヒト、サル、マウス、ラット、またはブタである、〔7〕に記載の

方法。

〔9〕 多分化能を有する細胞が、胚性幹細胞、成人幹細胞、間葉系幹細胞、または臍帯血細胞である、〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の（a）および（b）の工程、または〔5〕もしくは〔6〕に記載の（a）～（c）の工程を含む、肝細胞の製造方法。

〔11〕 肝細胞が成熟肝細胞である、〔10〕に記載の方法。

〔12〕 多分化能を有する細胞が哺乳動物由来である、〔10〕または〔11〕に記載の方法。

〔13〕 哺乳動物が、ヒト、サル、マウス、ラット、またはブタである、〔12〕に記載の方法。

〔14〕 多分化能を有する細胞が、胚性幹細胞である、〔10〕～〔13〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕 〔10〕～〔14〕のいずれかに記載の方法により製造された肝細胞。

〔16〕 〔15〕に記載の肝細胞を含む、肝疾患の治療剤。

〔17〕 肝疾患が、肝硬変、劇症肝炎、胆道閉鎖症、肝癌、または肝炎である、〔16〕に記載の治療剤。

〔18〕 以下の（a）～（c）のいずれかを含むキット。

（a）酸性線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子4および肝細胞増殖因子

（b）アクチビンA、上皮細胞増殖因子および β -神経生長因子から選択される増殖因子および酸性線維芽細胞増殖因子

（c）アクチビンAおよび肝細胞増殖因子から選択される増殖因子および線維芽細胞増殖因子4

〔19〕 さらに、オンコスタチンMを含む、〔18〕に記載のキット。

〔20〕 さらに、レチノイン酸、白血病阻害因子および肝細胞増殖因子から選択される少なくとも一つの増殖因子を含む、〔19〕に記載のキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明によって、多分化能を有する細胞をより効率的に分化誘導できるようになった。特に、本発明には、EBsを介さずにES細胞を分化誘導できるという利点がある。また、本発明によって、肝細胞、特に成熟肝細胞を効率よく得ることができるようになった。本発明の方法によって得られた肝細胞は、肝疾患の治療剤として利用できる。さらに、本発明のキットは、肝疾患の治療剤として利用可能な肝細胞の製造に利用できるだけでなく、多分化能を有する細胞の分化誘導の研究試薬としても利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、多分化能を有する細胞の分化誘導方法を提供する。本発明の方法を使用することで、人為的に疾患を誘発した動物個体の組織再生能力（マウス個体等）を用いることなくin vitroにおいて多分化能を有する細胞を分化誘導することが可能である。従来の方法では（Yamamoto H et. al., Hepatology 2003）、人為的に疾患を誘発した動物個体の組織再生能力を用いるため、動物愛護等を含む倫理的問題や未知の病原菌感染の可能性などの問題点があった。しかし、今回本発明者らが開発した分化誘導法は全工程が動物個体を用いることなく、無菌的かつ分化誘導の際に必要な材料は全て由来が明確である為、上述の問題点が無い。

【0011】

さらに、本発明の方法を使用することで、胚様体（EBs）を介さずにES細胞を分化誘導できる。EBsを介した細胞分化法では、種々の分化が一挙に起こるため、内胚様性の分化集団は少なく、また肝細胞の分化に至っては更にその中の一部の細胞に限られることとなり、高い肝細胞誘導効率は望めない。本発明の方法によって、ES細胞から飛躍的に効率良く肝細胞を得ることができる。なお、EBsとは、「ES細胞由来かつ前記した現象および性質を有している細胞集塊」を指す。マウス線維芽細胞やLIF添加培地上にて培養した多分

化能を維持しているES細胞を培養皿より回収し、マウス線維芽細胞やLIFを除き、さらにマトリクスコーティングしていない培養皿にて培養すると、ES細胞は培養液中に浮遊した状態で塊（細胞集塊）を形成し、細胞集塊内部では自発的かつ不規則に多様な細胞分化（三胚葉系に）が開始される。

【0012】

本発明の方法は、多分化能を有する細胞を、以下の（i）～（iii）のいずれかに記載の増殖因子を含む培地で培養する（工程（a））。

（i）酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、線維芽細胞増殖因子4（FGF4）および肝細胞増殖因子（HGF）

（ii）アクチビンA、上皮細胞増殖因子（EGF）および β -神経生長因子（ β NGF）から選択される増殖因子およびaFGF

（iii）アクチビンAおよびHGFから選択される増殖因子およびFGF4

【0013】

本発明においては、（i）に記載の増殖因子を用いることで、より効率的に多分化能を有する細胞を分化誘導できる。

【0014】

本発明において、多分化能を有する細胞としては、例えば胚性幹細胞（ES細胞）、成人幹細胞、間葉系幹細胞、または臍帯血細胞が挙げられるが、種々の種類の細胞に分化する能力を有している細胞であれば、本発明の多分化能を有する細胞に含まれる。

【0015】

また、本発明の多分化能を有する細胞が由来する生物種としては、好ましくは哺乳動物、より好ましくは霊長類、げっ歯類、偶蹄類であり、例えばヒト、サル、マウス、ラット、またはブタが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、細胞が由来する生物種と増殖因子が由来する生物種が異なっても、多分化能を有する細胞を分化誘導させることが可能である。例えば、カニクイザルES細胞でも、マウスES細胞でも、ヒト由来の増殖因子を使用することで分化誘導可能である。

【0016】

本発明の方法は、次いで、工程（a）で培養された細胞を、オンコスタチンMを含む培地で培養する（工程（b））。

【0017】

本発明の方法においては、工程（a）の前に、多分化能を有する細胞をレチノイン酸（RA）、白血病阻害因子（LIF）、およびHGFから選択される少なくとも一つの増殖因子を含む培地で前培養してもよい。この前培養工程を実施することで、多分化能を有する細胞を、より効率的に分化誘導できる。前培養工程では、RAに加えてLIFおよび／またはHGFを含む培地で培養することで、多分化能を有する細胞をより効率的に分化誘導できる。

【0018】

本発明における細胞培養法は、マトリクスコーティングが異なる培養皿、またはマトリクスコーティングの有無が異なる培養皿を用いた二次元培養法、マトリジェル等のソフトゲルやコラーゲンスポンジ等を用いた三次元培養法、またはそれらを併用する方法も可能であるが、好ましくは、マトリクスコーティングが異なる培養皿、またはマトリクスコーティングの有無が異なる培養皿を用いた二次元培養法であり、より好ましくは、前培養および工程（a）でゼラチンコーティング培養皿を用い、工程（b）でI型コラーゲンコーティング培養皿またはラミニンコーティング培養皿を用いる二次元培養法である。

【0019】

また、本発明の実施例において、工程（a）、（b）、前培養工程のより詳細な培養条件が開示されているが、本発明の方法の培養条件はこれら特定の条件に限定されるものではなく、一般的に許容される条件を取りうる。例えば、分化誘導開始時の細胞数としては、 $5.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6$ 細胞 / 培養皿の範囲を例示できる。また、分化誘導期間としては、例えば、工程（a）では2～10日間（好ましくは5日間）、工程（b）では1～4日間（好ましくは2日間）、前培養工程では2～5日間（好ましくは3日間）である。

【0020】

また、本発明における増殖因子としては、例えば、RA (all-trans-Retinoic Acid : 和光純薬株式会社)、LIF (ESGROTM (10⁷ units) : フナコシ株式会社)、HGF (Human HGF : 株式会社ベリタス)、aFGF (Human FGF-acidic : 株式会社ベリタス)、FGF4 (Human FGF-4 : 株式会社ベリタス)、および、OsM (Human Oncostatin M : 株式会社ベリタス)を用いることができるが、これらに限定されるものではない。

【0021】

また、本発明においては、前培養工程および工程 (a) を実施することによっても細胞を分化誘導できる。その場合、前培養工程においてRAに加えてLIFおよび／またはHGFを含む培地で細胞を培養することが好ましいが、それ以外の培地、例えばLIFのみ、HGFのみ、またはLIFおよびHGFを含む培地で培養しても、細胞を分化誘導可能である。さらに、前培養工程においてHGFのみを含む培地で細胞を培養し、直接工程 (b) に移行した場合も、細胞を分化誘導できる。本発明においてはこれらの方法もまた提供する。

【0022】

本発明においては、上記分化誘導方法によって、肝細胞、特に成熟肝細胞を製造できる。ES細胞から最終分化細胞が得られることは、肝細胞の発生分化研究領域において、その分化途中経緯を研究・解明するのに非常に有効である。また、成熟肝細胞は細胞移植治療を前提とした目的で利用できる可能性がある。さらに、未成熟肝細胞はまだ分化途中段階にあるため異分化・異常増殖 (癌化など) の潜在的可能性が成熟肝細胞よりも高いことが示唆され、この点からも、成熟肝細胞を獲得することによる利点は大きい。

【0023】

分化細胞が肝細胞であることは、肝細胞マーカー、または肝細胞の機能を指標に確認できる。また、肝細胞の機能としては、例えば、グルコース産生能及びアンモニア代謝能等が挙げられる。グルコース産生能は、グルコースオキシダーゼ法によって培養上清中のグルコースレベルを分析することで確認できる。アンモニア代謝能は、改変インドフェノール法 (Horn DB & Squire CR, Chim. Acta. 14: 185-194. 1966) によって、培養培地中のアンモニアレベルを分析することで確認できる。

【0024】

また、本発明は、上記工程により製造された肝細胞を提供する。このような肝細胞を用いることで、肝疾患の治療ができる。例えば、該肝細胞を直接的に肝門脈を通して移植する方法やコラーゲン、ポリウレタン、その他公知の生体親和性材料に包埋した形で移植する方法により、肝疾患を治療できる。このように、本発明は上記工程により製造された肝細胞の用途もまた提供する。より具体的には、肝細胞を含む肝疾患の治療剤を提供する。また、該肝細胞を用いた肝疾患の治療方法を提供する。本発明の肝疾患としては、肝硬変、劇症肝炎、胆道閉鎖症、肝癌、肝炎 (例えばウイルス性肝炎またはアルコール性肝炎) が挙げられるが、これらに限定されるものでない。

【0025】

また、本発明は、(i) aFGF、FGF4およびHGF、(i i) アクチビンA、EGFおよび β NGFから選択される増殖因子およびaFGF、または(i i i) アクチビンAおよびHGFから選択される増殖因子およびFGF4を含むキットを提供する。さらに本発明は、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsMを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsM、LIFおよびRAを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsM、HGFおよびRAを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsM、LIF、HGFおよびRAを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsMおよびRAを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsMおよびLIFを含むキット、(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsMおよびHGFを含むキット、または(i) ~ (i i i) のいずれかの因子とOsM、LIFおよびHGFを含むキットも提供する。

【0026】

これらキットは、本発明の方法に使用できる有用なキットである。また、本発明のキットは肝疾患の治療剤として利用可能な肝細胞の製造に利用できるだけでなく、多分化能を

有する細胞の分化誘導の研究試薬としても利用できる。例えば、本発明の方法の各工程で使用する分化誘導因子を混合した物を、各々水溶性カプセルに包埋し、培養液量に比例した量のカプセルを添加する。キット使用者の研究目的に応じて、培養液中における分化誘導因子濃度を、混合カプセルの添加量にて調節することが、また必要細胞数により分化誘導培養液量を変化させることが、さらに各工程に対応した分化誘導因子混合カプセルを準備することにより、各工程における継続および停止が可能である。またマトリクスコーティングの異なる培養皿（非マトリクスコーティングも含む）を用いた二次元培養、マトリジェル等のソフトゲルやコラーゲンスポンジ等を用いた三次元培養を可能とする培養条件と併用することにより、平面的または立体的に多分化能を有する細胞の分化誘導状況（細胞形態・組織の再構築・遺伝子およびタンパク質の発現変化等）が時間に拘束されることなく自由にかつリアルタイムに観察および実験に用いることができる。本分化誘導システムのキット化は、現在市販されている商品を組み合わせることで可能である。以上のことから本分化誘導システムは産業上利用可能であり、研究試薬としてキット化することは有益である。

【実施例】

【0027】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

(1) cDNAマイクロアレイによる偽処置およびCCl₄処置マウスの遺伝子発現分析

129SVJ系のマウスにCCl₄のオリーブ油液を処置し、一方、対照（偽）マウスにはオリーブ油のみを処置した。24時間後、肝臓からRNAを抽出し、cDNAクローン12,488個を含むDNAチップ上でマイクロアレイ分析を行った。アレイをアフィメトリクスジーンチップスキャナによって走査して、Microsoft Excelを用いて一次画像の分析を行った。

【0028】

(2) ES細胞の培養

ES細胞株ESJ1（129SVJ系）は、ゼラチンコーティング培養皿（イワキ、東京、日本）において、20%ウシ胎仔血清、非必須アミノ酸5ml、100×ヌクレオシド保存液（アデノシン4mg、グアノシン4.25mg、シチジン3.65g、ウリジン3.65mg、チミジン1.2mg）5ml、抗生物質-抗菌物質溶液（ギブコBRL、フナコシ、東京、日本）5ml、 β -メルカプトエタノール3.5 μ l、1000単位/ml組み換え型マウス白血病阻害因子（LIF）（エスグロ、フナコシ、東京、日本）および175 μ g/ml G418を含む400mlダルベッコ改変イーグル培地において5%CO₂インキュベータ内で未分化で維持した。肝細胞におけるEGFPトランスジーンを発現を促進するために、アルブミンプロモーター/エンハンサープラスミドを構築し、pALB-EGFPと命名した（Quinn G, et al., Res. Commun. 276 : 1089-1099. 2000）。アルブミンの発現は、GFP蛍光活性によって評価した。HepG2細胞（肝芽腫）のプロモーターに認められる強いシグナルは、pALB-EGFP（強化緑色蛍光蛋白質）構築物がES細胞の肝分化の指標として作用することを示す。G418抵抗性pALB-EGFP/ES細胞を調製して、文献に記述されているように培養した（Quinn G, et al., Res. Commun. 276 : 1089-1099. 2000）。該細胞は肝細胞のようなアルブミン産生細胞に分化した場合に、GFP発現細胞として検出可能である。該細胞を用いることによりフローサイトメトリーによるソーティング、またGFP量の測定による分化細胞の定量も行うことができる。

【0029】

(3) インビトロES細胞の分化

分化を誘導するために、ES細胞 5.0×10^5 個を、ゼラチンコーティングした培養皿でLIFおよび 1.0×10^{-8} Mオールトランスレチノイン酸（RA）（ワコウ、東京、日本）と共に37℃で3日間培養した。次に、予め培養したES細胞 5.0×10^4 個をゼラチンコーティングした培養皿に播種して37℃で5日間インキュベートした後、剥離した細胞の一部をコーティング培養皿に移して、さらにOsM（Human Oncostatin M、ベリタス、東京、日本）と共に37℃で2日間培養した（図1）。培地は毎日交換した。実験によっては、増殖因子（100ng/ml 酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、20ng/ml塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、50ng/ml

肝細胞増殖因子 (HGF)、20ng/ml 線維芽細胞増殖因子-4 (FGF4)、10ng/ml OsM、100ng/ml β -神経生長因子 (β NGF)、100ng/ml 上皮細胞増殖因子 (EGF)、および2ng/ml アクチビンA (ベリタス、東京、日本) を培養培地に加えた。

【0030】

(4) アルカリホスファターゼ活性の分析

RA処置ES細胞を4%パラホルムアルデヒドにおいて10分間固定して、その後100%EtOHで10分間固定した。H₂Oによって30分間洗浄した。アルカリホスファターゼ活性は、説明書に従って、ベクターレッドアルカリホスファターゼ基質キットI (フナコシ、東京、日本) によって検出した。

【0031】

(5) RT-PCR分析

総RNAを、ISOGEN (ニッポンジーン、東京、日本) を用いて抽出した。一本鎖cDNAは、総RNA2 μ g、オリゴ (dT)₁₈プライマー0.5 μ l、dNTPs10pmol、RAV-2 RTアーゼ5単位、および一本鎖合成緩衝液 (タカラ、京都、日本) を含む全量20 μ lにおいて合成した。合成は、36℃で10分間、42℃で1時間、56℃で10分間、および99℃で5分間行った。また、以下のプライマーを合成した (オリゴヌクレオチド配列は、センス、アンチセンスプライマーの順に括弧内に記載し、その後にアニーリング温度、PCRに用いたサイクル、および増幅した断片の長さを示す) : アルブミン (ALB) (5-GCTACGGCACAGTGCTTG-3 (配列番号: 1)、5-CAGGATTGCAGACAGATAGTC-3 (配列番号: 2) ; 60℃; 50サイクル; 260bp)、トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ (TO) (5-TGCGCAAGAACTTCAGAGTGA-3 (配列番号: 3)、5-AGCAACAGCTCATTGTAGTCT-3 (配列番号: 4) ; 56℃; 50サイクル; 419bp)、トランシレチン (tranthyretin) (TTR) (5-CTCACCACAGATGAGAAG-3 (配列番号: 5)、5-GGCTGAGTCTCTCAATTC-3 (配列番号: 6) ; 55℃; 50サイクル; 225bp)、チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) (5-ACCTTCAATCCCATCCGA-3 (配列番号: 7)、5-TCCCGACTGGAT AGGTAG-3 (配列番号: 8) ; 50℃; 50サイクル; 260bp)、 α -フェトプロテイン (AFP) (5-TCGTA TTCCAACAGGAGG-3 (配列番号: 9)、5-AGGCTTTTGCTTCACCAG-3 (配列番号: 10) ; 55℃、25サイクル; 173bp)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6P) (5-TGATTGCTGACCTGAGGAA C-3 (配列番号: 11)、5-CAAACACCGGAATCCATACG-3 (配列番号: 12) ; 62℃; 50サイクル; 352bp)、サイトケラチン18 (CK18) (5-TGGTACTCTCCTCAATCTGCTG-3 (配列番号: 13)、5-CTCTGGATTGACTGTGGAAGTG-3 (配列番号: 14) ; 60℃; 50サイクル; 382bp)、および β -アクチン (5-AGAGCAAGAGAGGTATCCTG-3 (配列番号: 15)、5-AGAGCATAGCCCT CGTAGAT-3 (配列番号: 16) ; 55℃; 25サイクル; 339bp)。増幅は、鋳型cDNA4 μ l、100 μ M dNTPs、プライマー10pmol、Ex-Taq 1.0単位およびEx-Taq緩衝液 (タカラ、京都、日本) を含む全量50 μ lにおいて行った。PCR後、少量を3.0%アガロースゲル上で泳動させて、エチジウムブロマイド (EtBr) によって染色した後、UV照射下で写真を撮影した。

【0032】

(6) ES由来肝細胞の生化学的分析

培養上清中のグルコースレベルを調べるために、グルコースオキシダーゼ法を用いて、培養したGFP陽性細胞分画を分析した (Sistare FD, et al., J. Biol. Chem. 260: 12748-12753. 1985)。アンモニアの解毒に関する細胞活性を調べるため、GFP陽性細胞分画を、2.5mM NH₄Clを含むDMEMにおいて培養して、さらに24時間インキュベートした。改変インドフェノール法 (Horn DB & Squire CR, Chim. Acta. 14: 185-194. 1966) によって、培養培地のNH₄Cl濃度を培養開始後0、6、12、18、および24時間後に調べた。

【0033】

[実施例1] cDNAマイクロアレイの分析

本発明者らは、CCl₄処置および偽処置のマウス肝臓において発現が異なる増殖因子の遺伝子を分析するためにcDNAマイクロアレイを用いた (表1)。

【0034】

【表 1】

寄託番号	遺伝子の名称	偽処置	CCl ₄	倍数
Y00848	線維芽細胞増殖因子 3	-128.3	82.7	~1.3
X14849	線維芽細胞増殖因子 4	140.9	331.5	2.4
M37823	線維芽細胞増殖因子 5	-219.9	210.4	~1.6
D12483	線維芽細胞増殖因子 8	-180.3	165.0	~1.7
D89080	線維芽細胞増殖因子 10	-483.5	345.7	~2.1
AF020737	線維芽細胞増殖因子 13	13.1	138.0	~1.7
AB004639	線維芽細胞増殖因子 18	-101.8	1.3	~1.0
X72307	肝細胞増殖因子	-19.0	196.6	~1.8
D63707	肝腫由来増殖因子	5718.3	12635.9	2.2
M17298	β -神経生長因子	-41.2	372.9	~2.6
X04480	インスリン様増殖因子 1	8120.7	42535.0	5.2
X71922	インスリン様増殖因子 2	-41.7	71.1	~1.3
K01668	肥満細胞増殖因子	46.5	95.6	2.1
M92420	トランスフォーミング増殖因子 α	79.5	394.7	~2.6
NM_021438	繊維芽細胞増殖因子 1	575.9	1046.2	1.8

遺伝子はGenBank(寄託番号)に従って記載し、倍数における波線(~)は、CCl₄処置マウス肝臓における新しい発現遺伝子を示している。値の遺伝子発現が何倍であるかはアナライザソフトウェアによって測定した。

【0035】

新しく発現した増殖因子遺伝子はCCl₄処置マウス肝臓において10種類であった(線維芽細胞増殖因子-3 (FGF-3)、線維芽細胞増殖因子-5 (FGF-5)、線維芽細胞増殖因子-8 (FGF-8)、線維芽細胞増殖因子-10 (FGF-10)、線維芽細胞増殖因子-13 (FGF-13)、線維芽細胞増殖因子-18 (FGF-18)、HGF、 β NGF、インスリン様増殖因子2 (IGF-2) およびトランスフォーミング増殖因子 α (TGF α)。5種類の増殖因子の発現は、CCl₄処置の肝臓において約1.8~5.2倍増加した (FGF4: 2.4倍、肝腫由来増殖因子 (HDGF): 2.2倍、インスリン様増殖因子1 (IGF-1): 5.2倍、肥満細胞増殖因子 (MCGF): 2.1倍および線維芽細胞増殖因子-1 (FGF-1): 1.8倍)。これらのデータは、いくつかの増殖因子が肝臓の再生に必要であることを示唆した。

【0036】

[実施例 2] レチノイン酸の影響

本発明者らは、単一の増殖因子、LIFとRAによるES細胞における分化の影響を検討した(図 2 A)。ES細胞の分化前の増殖因子を加える前の段階では、GFP陽性細胞は検出されなかった。LIFおよびRA添加培地を用いたGFP陽性細胞の誘導における効率的な培地条件および培養期間は3日間であった (n=2)。例えば、HGF、LIF、およびRA含有培地におけるGFP陽性細胞率は、4.11%から9.72%に変化した。これらの結果は、RA処置ES細胞が、EGFPの発現およびアルカリホスファターゼの染色によって、正常なES細胞としていくつかの分化能を保持していることを明らかに示している(データは示していない)。RAの作用に関して、LIFを添加した培地において培養したES細胞は、LIFを添加しない培地より効率的に分化誘導された。

【0037】

[実施例 3] ES細胞の分化における増殖因子の影響

本発明者らは、ES細胞からの分化誘導に及ぼす増殖因子の影響を調べるためにEGFPの発現を5日間調べた（図2B～E）。0sM単独または0sMといくつかの増殖因子の組み合わせの場合、FGF4混合培地がなければGFP陽性細胞の形成が初期段階から阻害された。同様に、aFGFはbFGFによる肝細胞の増殖を阻害し、FGF4ならびにbFGF、EGF、および β NGF混合物の組み合わせではGFP陽性細胞が検出されなかった。GFP陽性細胞の誘導は、aFGF、FGF4、およびHGF混合培地において3日以内に検出され、陽性率は $28.72 \pm 5.81\%$ （ $n=5$ ）であった。また、アクチビンAおよびaFGF混合培地、EGFおよびaFGF混合培地、 β NGFおよびaFGF混合培地、アクチビンAおよびFGF4混合培地、または、HGFおよびFGF4混合培地においても、それぞれの因子を単独で含む培地で培養したときより、GFP細胞陽性率が高かった。一方、GFP陽性細胞は、増殖因子培地で培養しなかった対照の培養皿では検出されなかった（データは示していない）。

【0038】

これまでES細胞からの分化誘導法は、まず最初にEBsを形成させ、三胚葉系に分化させることにより様々な細胞へと分化する能力を獲得すると考えられてきた。しかし、本実施例の結果から、多分化能はEBs形成により獲得されるのではなくES細胞が元来保有している能力であることが示唆され、また分化誘導効率はEBsを介した場合（Miyashita H, Suzuki A, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H: Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro. Cell Transplantation 11: 429-434. 2002）よりも約4～8倍以上高いことが確認された。

【0039】

以上より、培養液中に上記増殖因子を添加することにより、自発的かつ不規則に分化するEBsを介することなく、多分化能を有したES細胞をGFP陽性細胞へと約1/3の効率で分化誘導することが可能であることが示唆された。さらに、ES細胞を人為的操作により、直接分化および誘導できることが示唆された。

【0040】

〔実施例4〕 ES細胞の分化におけるマトリクスの影響

ES細胞の分化に対する培養皿のマトリクスの影響を検討するため（8日目）、本発明者らは、5種類のマトリクスコーティング培養皿におけるGFP陽性細胞の計数を行った（図3および4）。実験はRAおよびLIFを含有したゼラチンコーティング培養皿で3日間前培養を行い、次にHGF、aFGFおよびFGF4を含有したゼラチンコーティング培養皿で5日間培養後、その分化誘導細胞を0sMを含有した各コーティング培養皿で培養して行なった。その結果、GFP陽性細胞率は以下の通りであった：ゼラチン、 $2.26 \pm 0.36\%$ ；ラミニン（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）、 $24.1 \pm 4.97\%$ ；フィブロネクチン（ $6 \mu\text{g/ml}$ ）、 $6.5 \pm 1.57\%$ ；およびビトロネクチン（ $1 \mu\text{g/ml}$ ）、 $0.9 \pm 0.47\%$ 。GFP陽性細胞はI型コラーゲンコーティング皿において、 38.4% （ $34.17 \pm 4.91\%$ ）の最も発生率の高い分化したES細胞を含んだ（ $n=5$ ）。ラミニンおよびI型コラーゲンコーティング皿におけるES細胞の分化において、0sMによりGFPが強く発現した。しかし、その他のコーティング皿では、GFP陽性細胞率は減少した。同様に、第一段階でI型コラーゲンコーティング皿を用いると、GFP陽性細胞率は減少して、GFP陰性細胞の増殖活性は、GFP陽性細胞の分化と比較して最も速かった（データは示していない）。このデータは、ES細胞からの分化においてマトリクスの役割が重要であることを示している。

【0041】

〔実施例5〕 GFP陽性細胞型の分析

位相差顕微鏡によってGFP陽性細胞分画を調べた（図5）。GFP陽性点は、分化細胞と同一であり、GFP陽性の位置は、成熟肝細胞マーカーであるALBの産生によって示された。しかし、得られた結果は、肝細胞型とは対照的であった。

【0042】

〔実施例6〕 GFP陽性細胞分画における肝遺伝子発現と機能の分析

肝臓の分化レベルを評価するために、本発明者らは、GFP陽性細胞分画の肝特異的遺伝子のmRNA発現を調べた（図6A）。ALB、TO、TTR、TAT、CK18、およびG6Pを含む成熟肝細胞

胞のマーカーは、培養7日目に陽性であった。未成熟肝細胞の特異的マーカーであるAFPは検出されなかった。一方、培養5日目のHGF、aFGF、およびFGF4含有培地のGFP陽性細胞分画は、TAT、G6P、およびCK18を検出しなかった。さらに、ALBおよびT0の検出は低く、AFPは検出されなかった。偽処置のES細胞は、これらの肝細胞マーカー遺伝子を発現しなかった。これらの結果は、GFP陽性細胞が成熟肝細胞の特徴を有することを示唆している。成熟肝細胞は実質肝細胞における終末分化細胞であり、ES細胞から最終分化細胞が得られることは、肝細胞の発生分化研究領域において、その分化途中経緯を研究・解明するのに非常に有効である。また、成熟肝細胞は細胞移植治療を前提とした目的で利用できうる可能性が、肝疾患モデルマウスを用いたインビボ実験より確認されている (Yamamoto H, et al., Hepatology, 37: 983-993, 2003, Teratani T, et al., 2003. submission)。さらに、未成熟肝細胞はまだ分化途中段階にあるため異分化・異常増殖（癌化など）の潜在的可能性が成熟肝細胞よりも高いことが示唆され、この点からも、成熟肝細胞を獲得することによる利点は大きい。

【0043】

GFP陽性細胞分画が肝細胞特異的機能を有するか否かをさらに解明するために、本発明者らは生化学分析を行った (n=2)。その結果、GFP陽性細胞分画がグルコース産生能を示しうること (図6B)、そして培養培地からアンモニアを消失させることが判明した (図6C)。これらの結果は、ES細胞から分化した肝細胞が、代謝活性を含む肝細胞特徴を保持しながらかなりの期間、インビトロで増殖しうること示している。

【0044】

【実施例7】 本発明によって誘導されたES細胞由来の肝細胞の移植による肝硬変モデルマウスの治療

ジメチルニトロソアミン(DMN)を雌マウス(週齢8週、129SV系統)の腹腔内に週3回連続投与し、これを4週連続で行なうことで、人為的に肝硬変を誘発した。DMNは、マウス体重1kgあたり1mlの生理食塩水に、1%相当量投与した。肝硬変誘発の有無は、組織切片(肝臓)の検鏡により繊維化の存在と血清中のGOTおよびGPT測定を行い得られた数値結果より確認した。DMN投与終了後の4週目に 1.0×10^6 個/マウス、i.v.の本分化誘導系を用いて作成したGFP陽性細胞(マウスES細胞由来肝細胞)を尾静脈から注入した。コントロール群には生食を投与し、各群はマウス8匹により行った。移植24時間後、肝臓切片を蛍光顕微鏡にて観察した結果、GFP-陽性細胞である肝細胞は、すでに肝臓の肝硬変部位近くに生着していることが示された(図7)。

【0045】

また、生存率においても、GFP陽性細胞投与群と非投与群を比較した結果、極めて明瞭な差異が認められ、非投与群ではDMN投与4週後に全て致死であったのに対し、GFP陽性細胞投与群では75%が生存し、GFP陽性細胞投与群で有意に延命効果があることが確認された(図8)。

【0046】

さらに、血中のフィブリノーゲン量およびアルブミン量の変動について調べたところ、移植後2週間で、フィブリノーゲン量およびアルブミン量ともに正常値近くまで回復していることが判明した(図9および10)。

【0047】

また、DMN処理のマウスに対照のPBSを投与して3週間後の肝細胞を観察した結果、顕著な肝細胞の細胞死と線維化が確認できたが、同じくDMN処理のマウスに、GFP-陽性の肝細胞を移植して3週間後の肝細胞の組織染色像では、線維化の顕著な改善が認められた(図11)。

【0048】

これらの結果は、本発明によって誘導されたES細胞由来の肝細胞を移植することで肝硬変を治療できることを示唆している。

【0049】

【実施例8】 カニクイザルES細胞から分化誘導された肝細胞の肝遺伝子発現と機能の分

析

本発明者らは、マウスES細胞から得た知見を基に、霊長類であるカニクイザル (CM) ES細胞を用いた肝細胞への分化誘導を試みた。CMES細胞を、ゼラチンコーティング培養皿 (イワキ) において、20% ウシ胎仔血清、非必須アミノ酸5ml、ヌクレオシド保存液5ml、 β -メルカプトエタノール $3.5\mu\text{l}$ 、1000単位/ml LIFおよび $50\mu\text{g/ml}$ G418を含む400mlダルベッコ改変イーグル培地において培養し、pALB-EGFPをエレクトロポレーション法により導入し、G418抵抗性pALB-EGFP/CMES細胞を調製した。得られたpALB-EGFP/CMES細胞はアルカリフォスファターゼ活性 (図 1 2 A) および胚様体形成能を有していること (図 1 2 B) から、未分可能を保持していることが示された。

【 0 0 5 0 】

次に、マウスES細胞で確立した本発明のインビトロ分化誘導系を適用して、CMES細胞を肝細胞に分化誘導させた。具体的には上記条件で調整したpALB-EGFP/CMES細胞 5.0×10^5 個を、ゼラチンコーティングした培養皿で1000 単位/ml LIFおよび $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ RAと共に 37°C で3日間培養した。次に、予め培養したES細胞をゼラチンコーティングした培養皿に播種してHGF 50 ng/ml, FGF4 20 ng/mlおよび aFGF 100 ng/mlを加えて 37°C で10日間インキュベートした。さらに剥離した細胞の一部をI型コラーゲンコーティング皿に移して、さらにOsM 10 ng/mlと共に 37°C で3日間培養した。分化誘導開始時から16日後の分化細胞に対して、GFP陽性細胞分画を調べたところ、GFP陽性の位置が成熟肝細胞マーカーであるALBの産生によって示された (図 1 3 A)。さらに、肝臓の分化レベルを評価するために、GFP陽性細胞分画の肝特異的遺伝子のmRNA発現を調べた結果、ALB、T α 、TAT、およびG6Pを含む成熟肝細胞のマーカーは陽性であった (図 1 3 B)。これらの結果から、本実施例で得られたCMES細胞から分化誘導された細胞は、肝特異的マーカー、代謝機能、形態学的に肝細胞であり、霊長類のES細胞からも肝細胞が作成可能であることが証明された。

【 0 0 5 1 】

本実施例によって、pALB-EGFPトランスフェクトES細胞をHGF、FGF4、aFGF、OsMを添加したDMEMにおいて培養して、マトリクスをゼラチンからI型コラーゲン系に変更すると、マウスES細胞が肝特異的機能を有する肝細胞に分化することが証明された (図 1)。この系の最も重要な点は、分化前に、LIFおよびRAを含む培地によってES細胞を3日間培養したこと、およびインビトロでES細胞からGFP陽性細胞の効率的な分化が得られたことである。マウスES細胞は、インビトロで3つ全ての胚葉 (中胚葉、外胚葉、および内胚葉) の派生物を生じることができることから、十分な発達能を有すると考えられる (Evans MJ, Kaufman MH, Nature 292:154-156, 1981, Martin GR, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 7634-7638, 1981)。P19およびF9胚癌細胞分化系を用いた発達生物学より、それらの細胞は、インビトロで分化することができ、3つの胚葉全ての派生物を、培養およびAFPの合成と共にRA濃度に応じて得ることができると報告されている (Sasahara Y, et al., J. Biol. Chem. 271 : 25950-25957, 1996, Grover A & Adamson DE, Dev. Biol. 114 : 492-503, 1986, Hogan BLM & Tilly R, J. Embryol. Exp. Morphol. 62 : 379-394, 1981, Hogan BLM, et al., Cancer Surveys. 2 : 115-140 1983, Grover A, et al., J. Cell Biol. 96 : 1690-1696, 1983)。このように、誘導的な3つの胚葉の点において、P19およびF9細胞は、培養培地にRAを添加しなくとも、ES細胞の特徴と全く類似である。これに関連して、本発明者らは、GFP陽性細胞の分化がLIFおよびRAを用いる有効な条件で決定されることを証明した (図 2 A)。したがって、肝細胞の分化は、LIFとRAとを培養培地に添加すると効率的に誘導される。しかし、ES細胞は前培養を行わなくとも、効率は落ちるが、肝細胞を誘導することは可能である (図 2 A)。次に重要な3つの増殖因子 (aFGF、HGF、およびFGF4) をES細胞と共にゼラチンをコーティングした培養皿で5日間培養し、I型コラーゲンコーティング皿および増殖因子 (OsM) に変更して2日間培養すると、ES細胞からの分化が得られた (図 2 B ~ 2 E、図 3 および図 4)。FGF-1としてのaFGFは、ヘパリン結合増殖因子であり、これは間葉細胞、神経外胚葉細胞、および内皮細胞を含む多様な細胞の増殖を刺激する (Dungan KM, et al., J Exp Zool. 292: 540-54, 2002)。HGFは、成熟肝細胞および胆管上皮細胞の強力なミトゲンである (Nakamura T, et al., Na

ture. 342 : 440-443. 1989、Jopin R, et al., J. Clin. Invest. 90 : 1284-1289. 1992)。さらに、heparin binding secretory transforming factor-1 (HST-1) としてのFGF 4は、最初の内胚葉パターン形成において重要であり、内胚葉の特定化において何らかの役割を有する可能性がある (Wells JM & Melton DA, Development. 127 : 1563-1572. 2000)。OsMは、多様な腫瘍および正常細胞に多様な影響を及ぼす重要な増殖調節サイトカインであり、肝細胞代謝活性において機能をアップレギュレーションすることが同定された (Sakai Y, et al., Cell Transplant. 11: 435-441 2002)。

【0052】

本発明者らは、CCl₄処置および偽処置マウス肝臓において増殖因子のmRNAレベルの発現変化を調べるために、cDNAマイクロアレイを分析した (表1)。最近の研究から、肝腫由来増殖因子 (HDGF) が発達途中の肝臓において非常に多く発現され、マウスにおける胎仔肝細胞の増殖を促進し、IGF-1およびIGF-2がラットの肝細胞の分化において誘導されることが示唆された (Enomoto H, et al., Hepatology. 36: 1519-1527. 2002、Streck RD & Pintar JE, Endocrinology. 131: 2030-2032. 1992)。HGFおよびTGF α は、肝細胞増殖の様々な段階に関係している (Fausto N, J. Hepatol. 32: 19-31. 2000、Michalopoulos G K & DeFrances MC, Science. 276: 60-66. 1997)。さらに、既に、本発明者らはウェスタンブロットング分析によってマウス肝臓の再生時におけるHGFの発現を検出している。ゆえに、cDNAマイクロアレイデータは信頼できる。一方、本発明者らは、ES細胞からの肝細胞の分化作用がマトリクスに関連することを見出した (図4)。通常、肝細胞の培養には、コラーゲンおよびラミニンコーティング皿を用いる。それによって、EBsを介することなくES細胞から機能的な肝細胞の効率的な分化が得られた。メカニズムをより詳しく理解するには、いくつかの肝疾患の増殖因子発現のような肝再生が必要であった (Fausto N, J. Hepatol. 32: 19-31. 2000、Hoffman AL, et al., Seminars Liv. Dis. 14: 190-210. 1994)。

【0053】

これまでの報告は、内胚葉特異的遺伝子発現がEBsにおける臓器の内胚葉に由来することを示唆したが (Abe K, et al., Exp. Cell Res. 229: 27-34. 1996)、本実施例では、成熟肝細胞マーカーの発現が検出された。例えば、TTRは、内胚葉または卵黄嚢様の分化を表し、肝臓の成熟のあいだ発現される (Makover A, et al., Differentiation. 40:17-25. 1989)。成熟肝細胞によって合成される最も豊富な蛋白質であるALBの発現は、初期胎児肝細胞 (E12) に始まり、成人肝細胞において最高レベルに達する (Sellem CH, et al., Dev. Biol. 102:51-60. 1984)。TATは周産期または生後の肝細胞特異的分化の優れた酵素マーカーである。この酵素は、出生前は有意な量で合成されないが、生後の発達期間の初期に急速に活性化される (Greengard O, Science. 163:891-895. 1969)。G6P発現は周産期の肝臓に認められ、その蛋白質は、糖新生において何らかの役割を有する (Burcelin R, et al., J Biol Chem. 275:10930-10936. 2000)。最近報告されたEBsの肝細胞への分化では、ゼラチンコーティング皿に播種して、LIFおよび増殖因子を含まずに数日間インキュベートした (Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M et al., FEBS Lett 497:15-19, 2001、Miyashita H, et al., Cell Transplantation. 11: 429-434. 2002)。同様に、本発明者らは、RT-PCRによって、肝細胞としての分化したGFP陽性細胞分画において肝細胞遺伝子を検出した (図6 A)。その上、本発明者らが、インビトロでGFP陽性細胞分画における代謝活性を調べたところ、ES細胞における肝細胞は肝機能を発現した (図6 BおよびC)。このことは、ES細胞からの機能的成熟肝細胞の分化がEBs細胞を介さないこと、そして形成期間がEBsを介した一般的な方法より短くなりうることを示唆する。

【0054】

本発明者らは、ES細胞を肝損傷マウスレシピエントに移植し、定着すると、それらが肝細胞に分化することができることを既に示している。それによって、この系において発生した全奇形腫14~28%に関して、ES細胞を機能的肝細胞に分化誘導することができた (Yamamoto H, et al., Hepatology. 37 : 983-993. 2003)。しかし、インビトロ系によって肝細胞の産生を得たものの、これは当初の肝細胞とES細胞との融合細胞である可能性が示

唆されていた。しかし、本発明で、機能的肝細胞がインビトロでES細胞から直接誘導され、そしてGFP陽性細胞が正常な肝細胞とES細胞との融合産物ではなかったことを初めて明らかに証明するデータが示された。

【0055】

本発明により、ES細胞のインビトロでの分化系が、肝臓の発達における特異的増殖因子および細胞内シグナル伝達分子の役割を解析するための有用なモデルであり、肝疾患を救うために適用可能な幹細胞治療の基礎となる可能性があることが証明された。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】 ES細胞のインビトロ分化誘導を示す図である。本発明において用いたインビトロ分化プロトコールは、実施例に説明した通りである。

【図2】 GFP陽性細胞誘導能に及ぼす増殖因子の影響を示すグラフである。(A) 単一の増殖因子(白い棒グラフ: RA無処置ES細胞、黒い棒グラフ: RA処置ES細胞)、(B)、(C) および (D) 2つの増殖因子混合物、(E) 3つの増殖因子混合物。増殖因子の最終濃度は実施例に記載した。(B) および (E) は、LIFの存在下でRAを含む培地において3日間前培養した。その割合は、平均スコアで示した(HGF、FGF4、およびaFGF: n=5、その他: n=2)。

【図3】 GFP-陽性細胞を蛍光顕微鏡によって可視化した写真である。(A) および (B)、I型コラーゲンコーティング皿、(C) ゼラチンコーティング皿、(D) ラミニンコーティング皿、(E) フィブロネクチンコーティング皿、および (F) ビトロネクチンコーティング皿。I型コラーゲンおよびゼラチンコーティング皿はイワキ社(東京、日本)から得て、ラミニン、フィブロネクチン、およびビトロネクチンコーティング皿は、実施例に記載されているように細菌培養皿から作製した(ATG、東京、日本)。陽性細胞の割合はハイスコアを示したものもある(n=5)。オリジナルの倍率は20倍である。

【図4】 いくつかのマトリクスにおけるGFP陽性細胞率を示すグラフである。データは平均値±S.D.を表す(*: P<0.0001; **: P<0.01)。

【図5】 ES細胞の分化におけるGFPの発現を示す写真である。(A) 蛍光顕微鏡を用いて細胞を可視化した。(B) 位相差顕微鏡を用いて細胞を観察した。(C) フォトショップバージョン5.0(アドブ)を用いて(A) および (B) の写真をコンビネートした。

【図6】 インビトロで培養した分化したES細胞の肝細胞特異的マーカー遺伝子と代謝活性の分析を示す写真およびグラフである。(A) 分化した肝細胞特異的マーカー遺伝子の発現。レーン1: 分化したES細胞分画(7日)、レーン2: 分化したES細胞分画(5日)、レーン3: 無処置ES細胞、レーン4: 陽性対照(ALB、TO、TTR、TAT、CK18、G6P、およびβアクチンは、マウス肝臓であった; AFPはHepG2であった)、レーン5: 鋳型なし、およびレーン6: 無処置ES細胞のゲノムDNA。(B) 播種後1日目、ES細胞の分化を、培養上清におけるグルコースレベルに関して分析した。(C) 播種1日後、ES細胞の分化を培養からアンモニアの消失能に関して調べた(●)。対照として、pALB/EGFP細胞を用いた(○)。BおよびCは、平均スコアを示した(n=2)。

【図7】 GFP陽性肝細胞が肝臓の肝硬変部位近くに配置していることを示す写真である。

【図8】 GFP陽性細胞投与群と非投与群との生存率を比較したグラフである。

【図9】 血中のフィブリノーゲン量の変動を示すグラフである。(*: P<0.009)

【図10】 血中のアルブミン量の変動を示すグラフである。(**: P<0.003)

【図11】 DMN処理マウスの組織染色像を示す写真である。AはDMN処理のマウスに対照のPBSを投与して3週間後の肝臓の組織染色像である。BはDMN処理のマウスに、GFP陽性肝細胞を移植して3週間後の肝臓の組織染色像である。

【図12】 pALB-EGFP/CMES細胞のアルカリフォスファターゼ活性(A)、および胚様体形成能(B)を示す写真である。

【図 1 3】 インビトロでCMES細胞から分化誘導されたGFP陽性細胞を分析した写真である。(A) 左の写真は位相差顕微鏡、右の写真は蛍光顕微鏡を用いた細胞写真である。(B) 肝細胞特異的マーカー遺伝子の発現を示す。レーン1：pALB-EGFP/CMES細胞のGFP陽性画分のcDNA、レーン2：未分化のpALB-EGFP/CMES細胞のcDNA、レーン3：CM肝細胞のcDNA、レーン4：pALB-EGFP/CMES細胞のcDNAのゲノムDNA。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Effector Cell Institute, Inc.
Ochiya, Takahiro

<120> Method for inducing differentiation of multipotential cells

<130> KAN-X0301

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 1
gctacggcac agtgcttg 18

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 2
caggattgca gacagatagt c 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 3
tgcgcaagaa cttcagagtg a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 4
agcaacagct cattgtagtc t 21

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 5
ctcaccacag atgagaag 18

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 6
ggctgagtct ctcaattc 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 7
accttcaatc ccatccga 18

<210> 8
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 8
tcccgactgg ataggtag 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 9
tcgtattcca acaggagg 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 10
aggcttttgc ttcaccag 18

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 11
tgattgctga cctgaggaac 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 12

caaacaccgg aatccatacg

20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 13

tggtactctc ctcaatctgc tg

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 14

ctctggattg actgtggaag tg

22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 15

agagcaagag aggtatcctg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

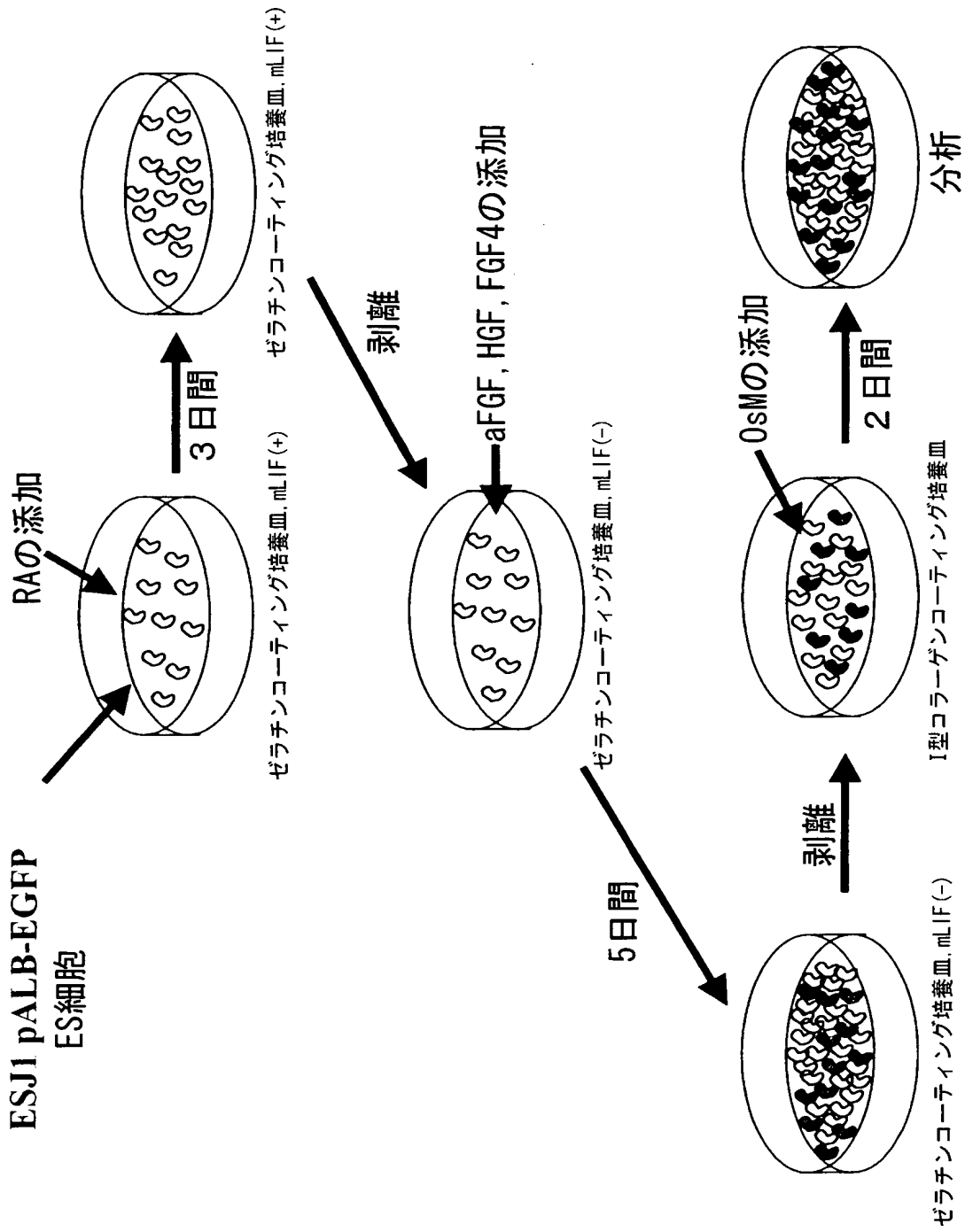
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 16

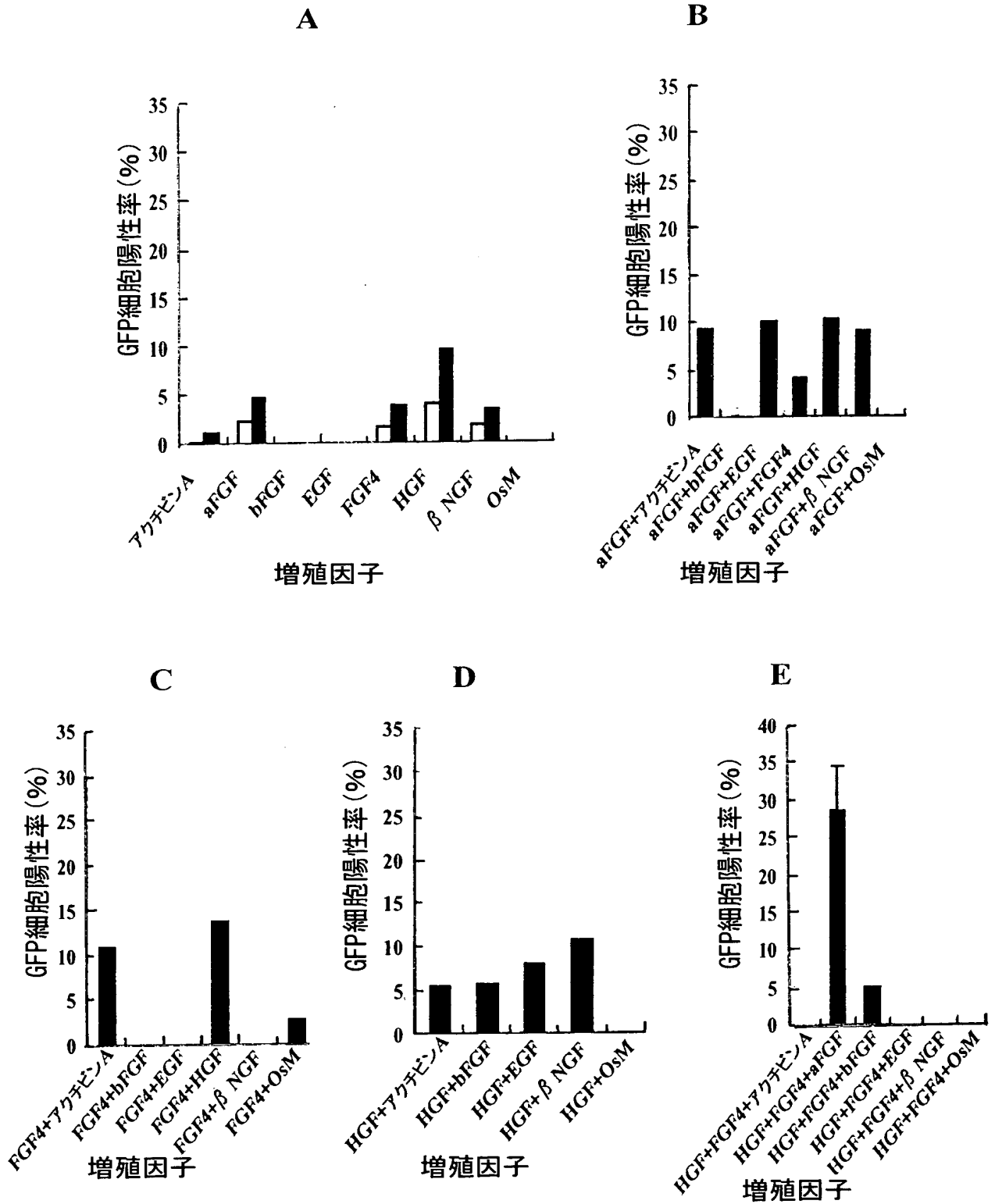
agagcatagc cctcgtagat

20

【書類名】 図面
【図 1】

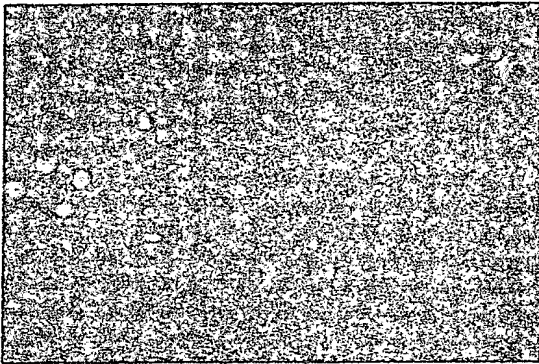


【図 2】



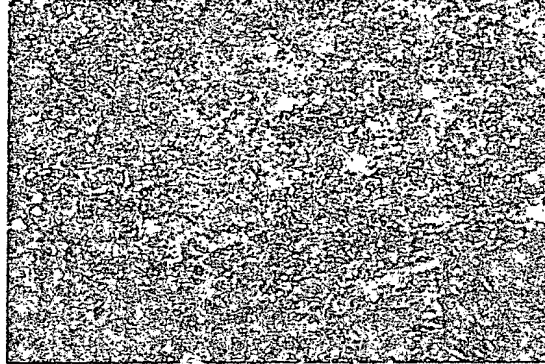
【図 3】

A

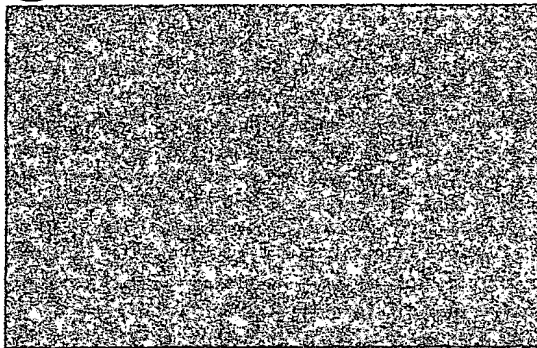


GFP細胞陽性率：38.4%

B

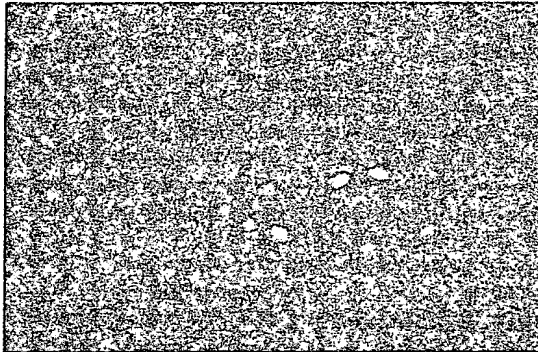


C



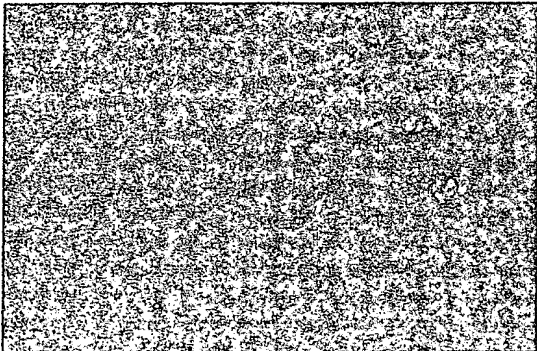
GFP細胞陽性率：2.8%

D



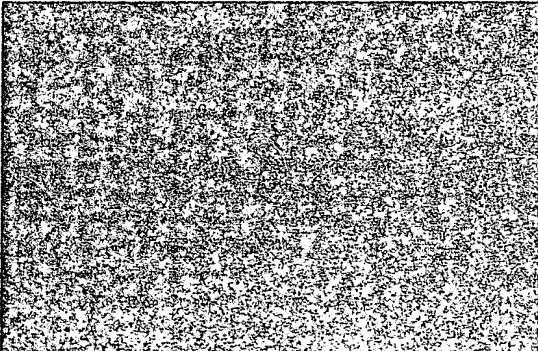
GFP細胞陽性率：29.6%

E

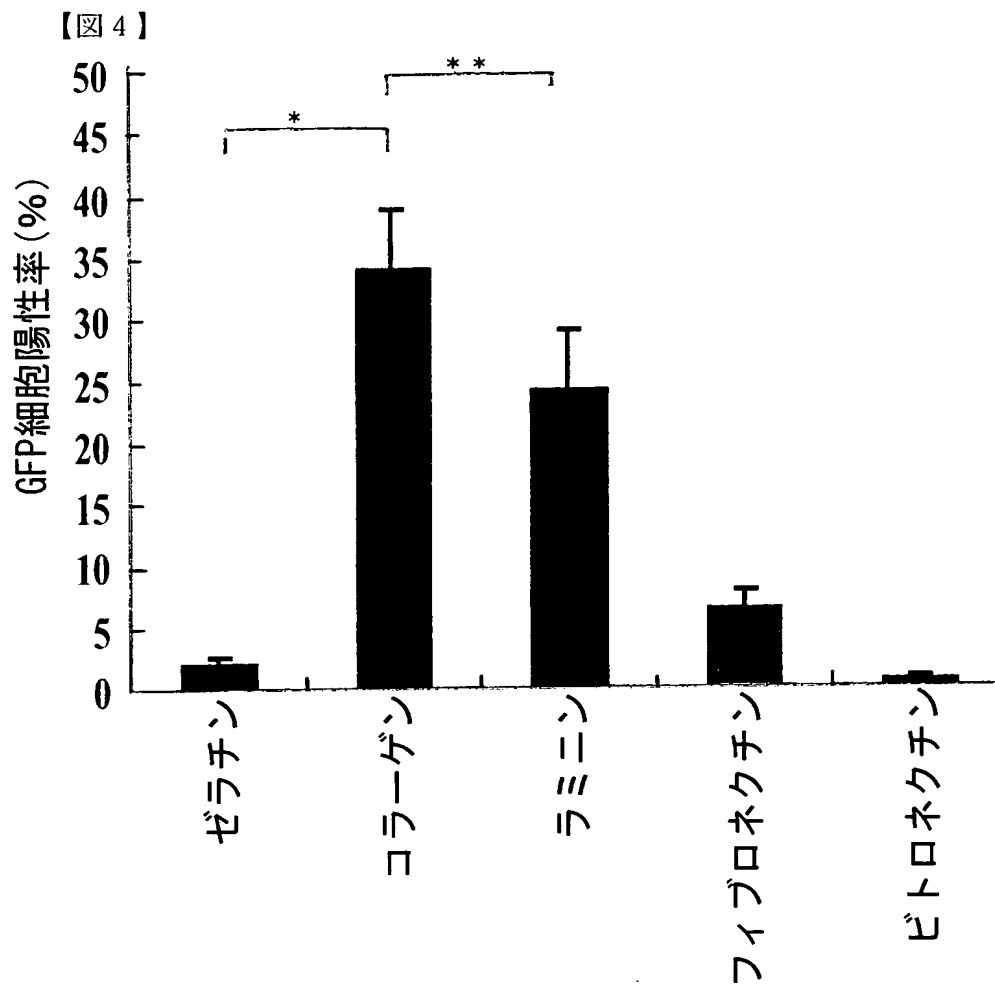


GFP細胞陽性率：8.4%

F

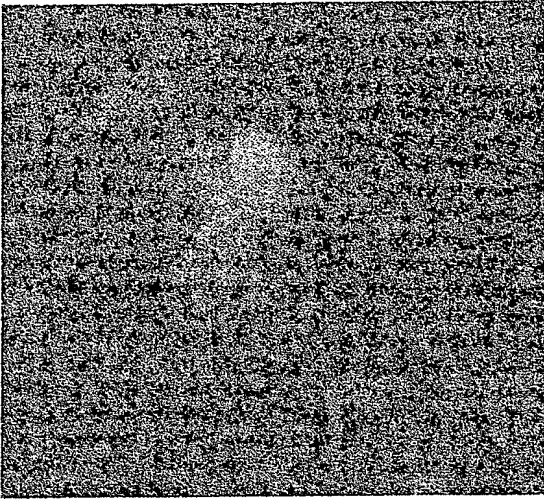


GFP細胞陽性率：1.6%

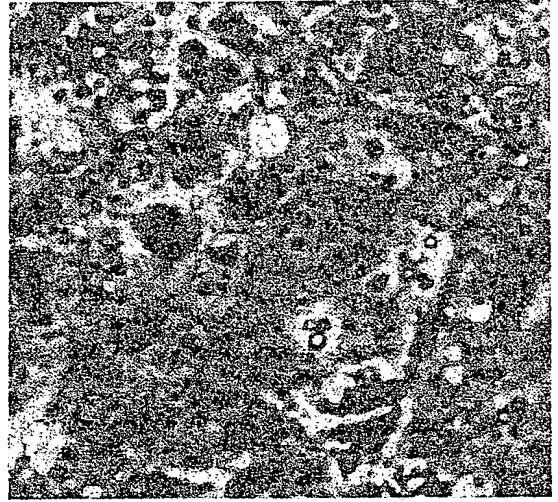


【図 5】

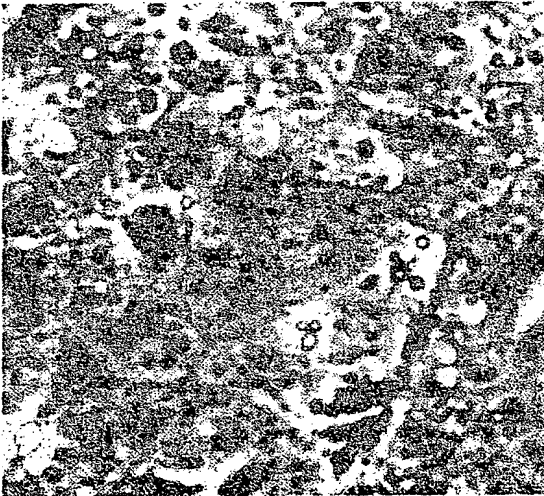
A



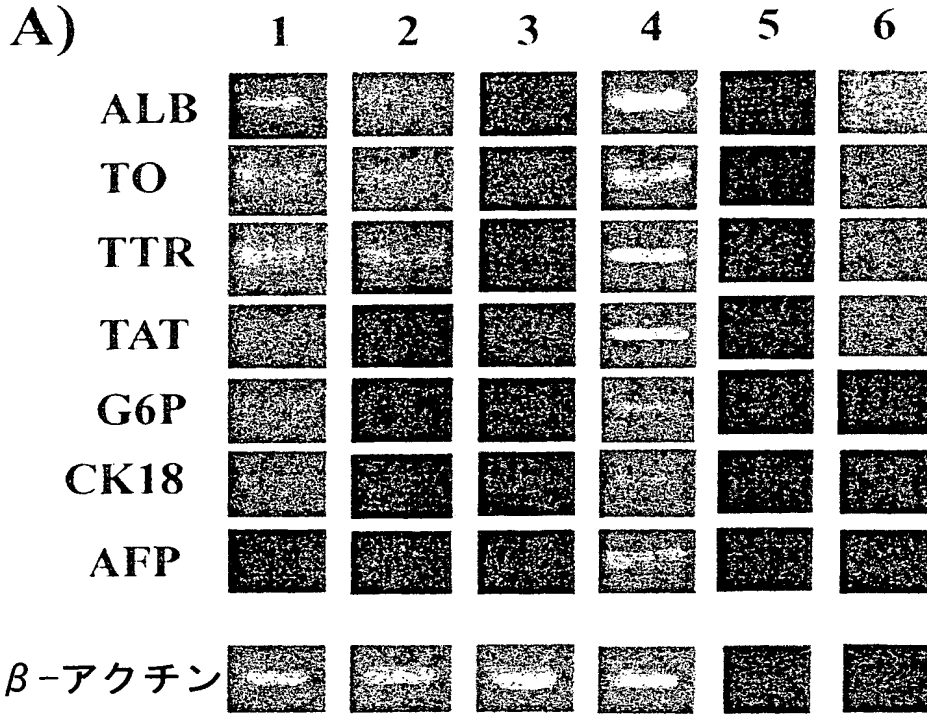
B



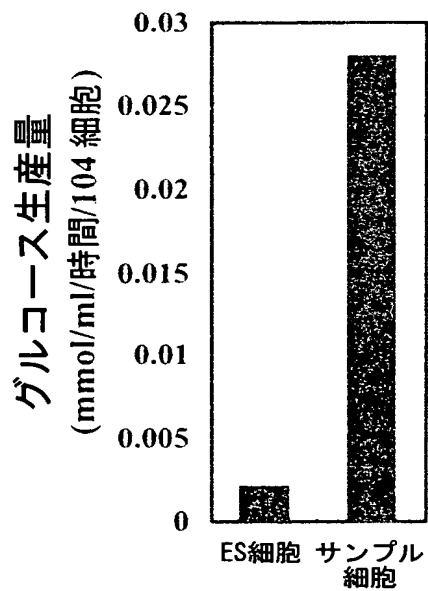
C



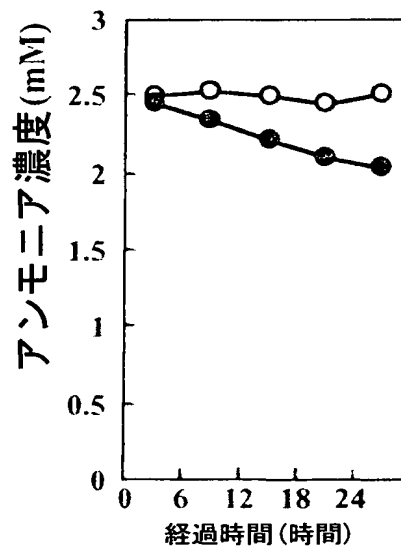
【図 6】



B)

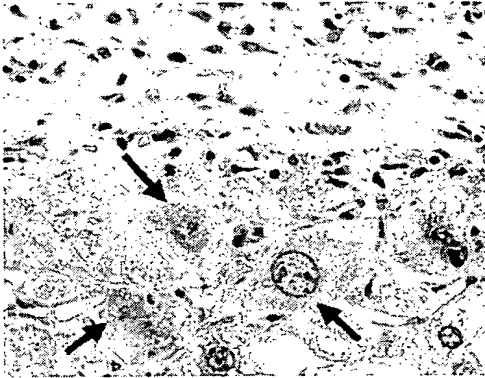


C)



【図 7】

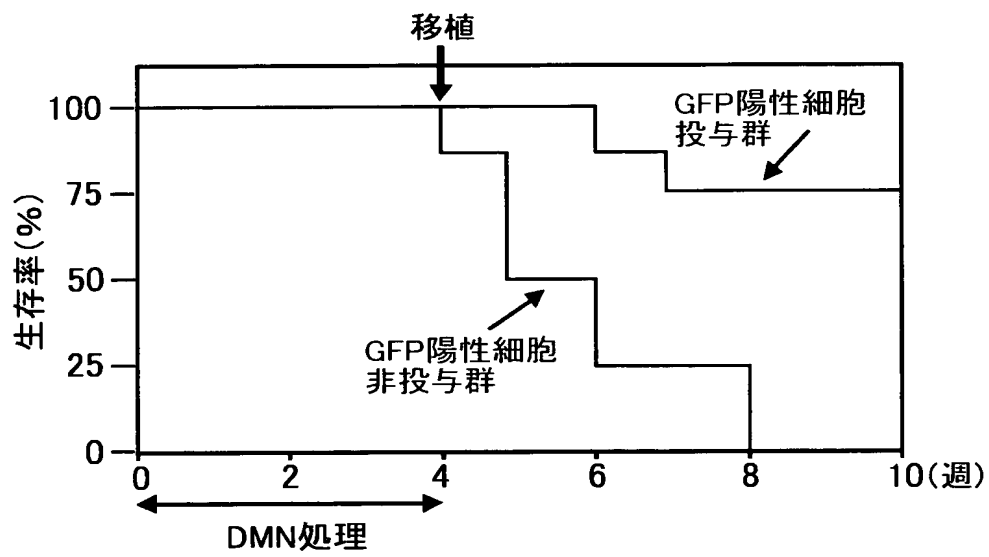
HE 染色



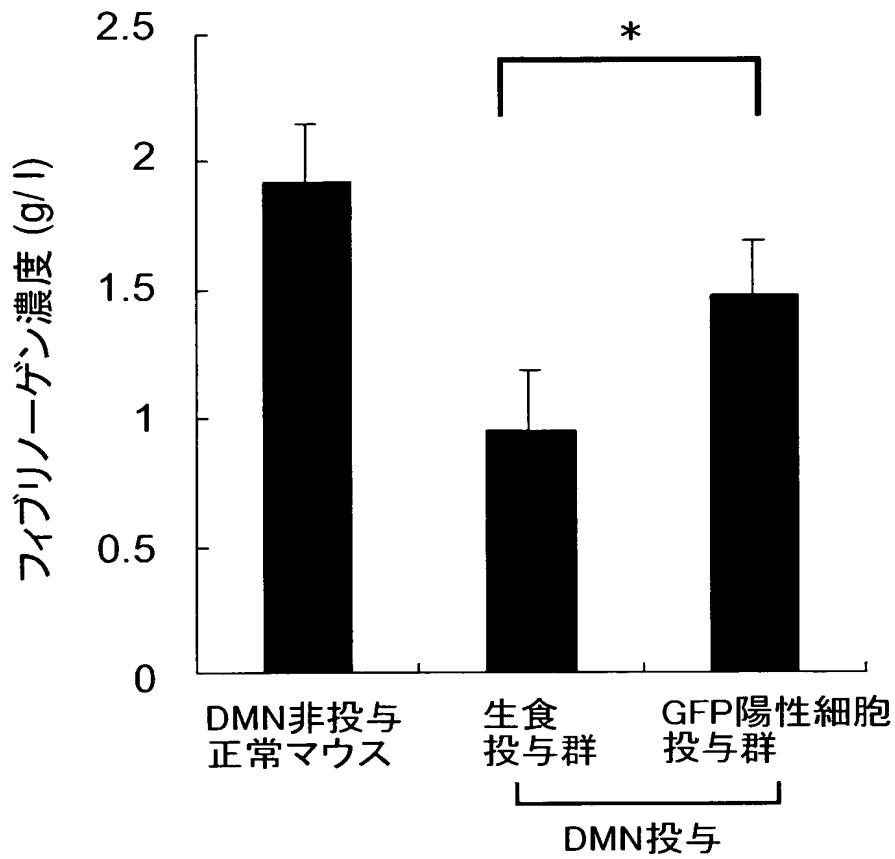
GFP-陽性細胞



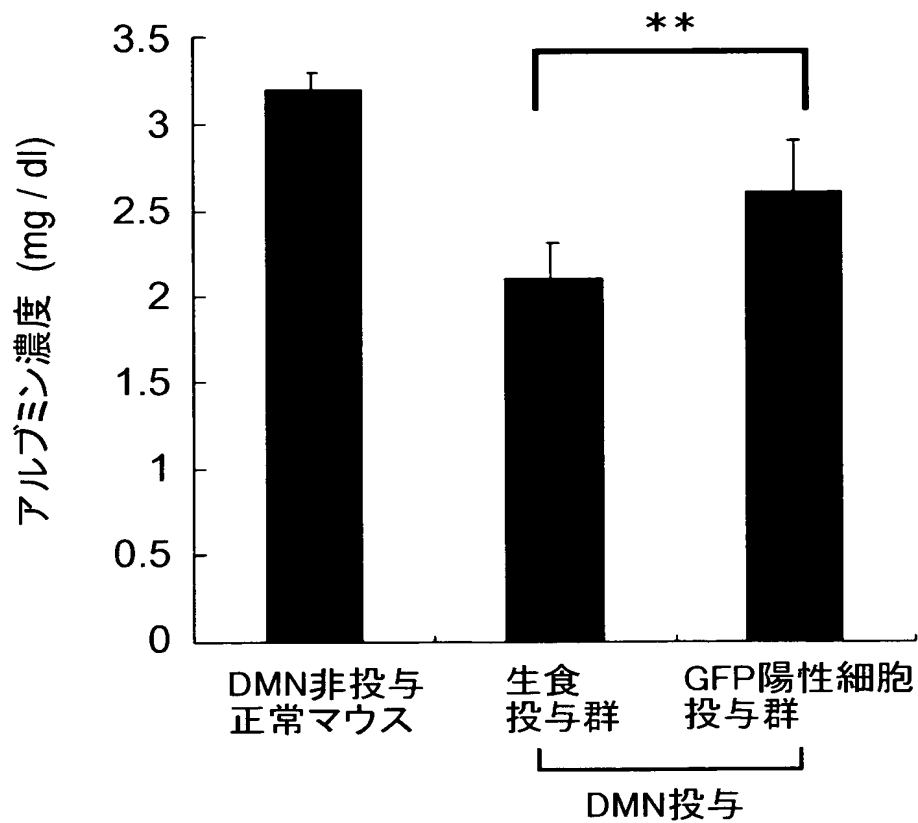
【図 8】



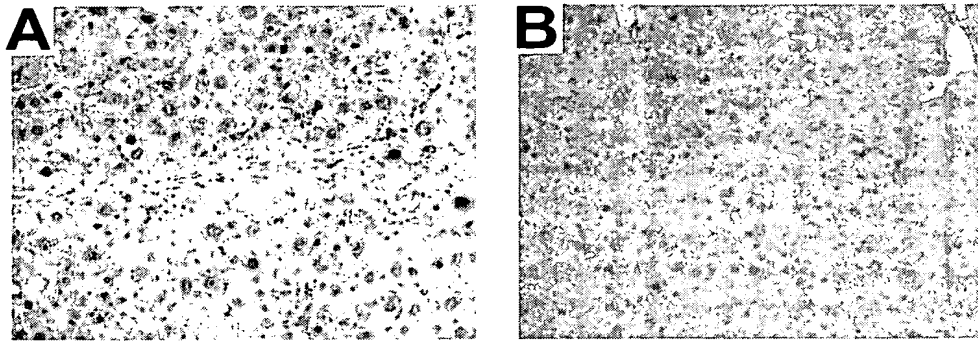
【図 9】



【図 10】

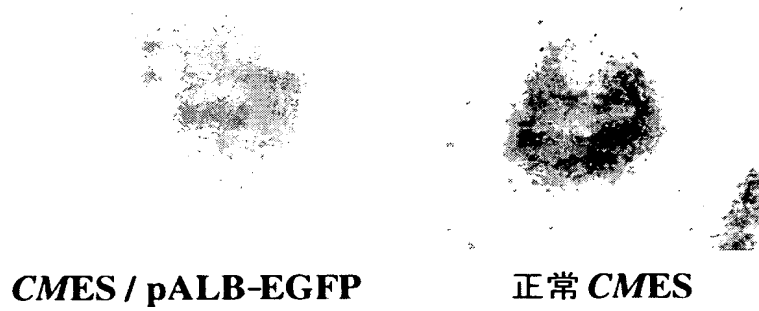


【図 11】

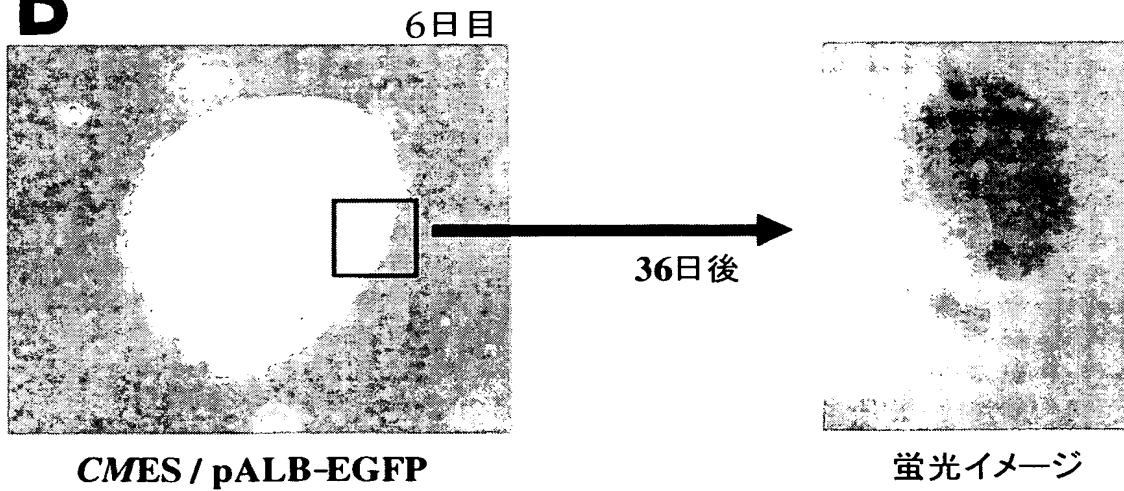


【図 12】

A

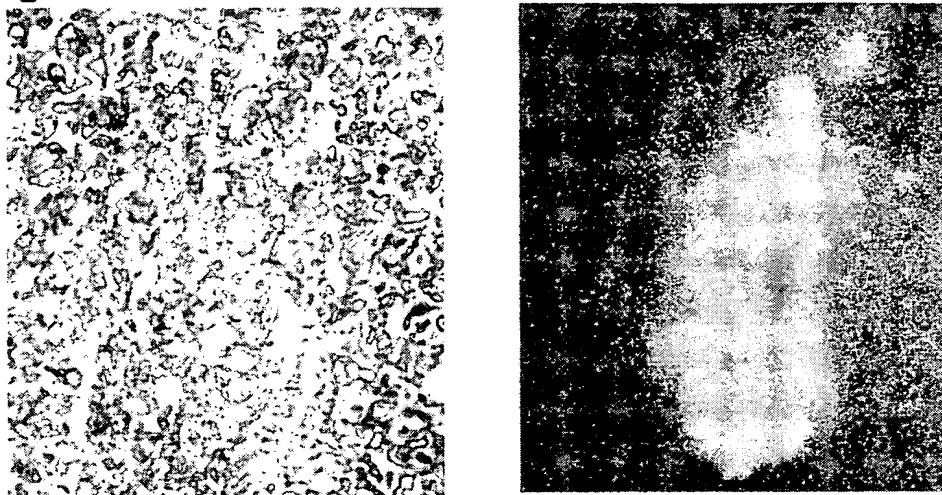


B



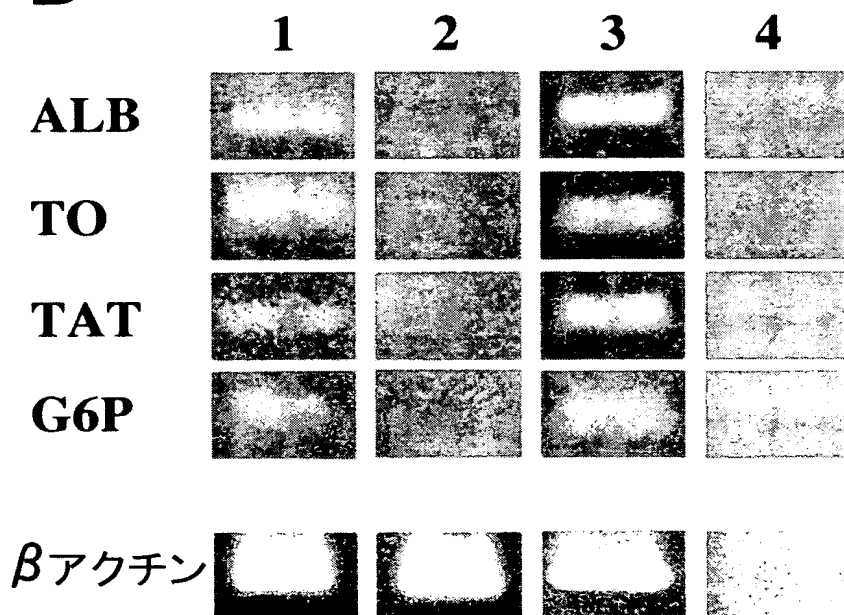
【図 13】

A



16日

B



【書類名】要約書

【要約】

【課題】多分化能を有する細胞の分化誘導に關与する因子を同定し、該因子の利用法を提供することを課題とする。

【解決手段】cDNAマイクロアレイ技術によって偽処置およびCCl₄処置マウス肝臓の間で24時間後に可変の遺伝子を発現分析し、いくつかの増殖因子を選択した。次に、ES細胞の肝細胞分化率に及ぼすマトリクスおよび増殖因子の影響を調べた。その結果、本発明者らは、異なる2つのマトリクス培養皿において、いくつかの増殖因子含有培地での単純な接着単培養によって、EBsを介さずに、ES細胞から肝細胞の分化に成功した。

【選択図】なし

特願 2 0 0 3 - 2 9 5 5 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 2 0 1 4 0 6]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 4 月 2 8 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都目黒区駒場 4 - 6 - 2 メゾン駒場 4 0 1 号
氏 名	株式会社 エフェクター細胞研究所

特願 2 0 0 3 - 2 9 5 5 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 2 9 9 2 9 5]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 8 月 1 9 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区築地 5 - 1 - 1 国立がんセンター築地宿舎 2 1
8 号

氏 名 落谷 孝広